

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA

GLAUCIENE DA SILVA SANTOS

OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DE SISTEMAS  
ESTABILIZADOS POR TENSOATIVOS CONTENDO ÓLEO  
ESSENCIAL *Syzygium aromaticum* COM POTENCIAL PARA  
CONTROLE LARVICIDA DE *Aedes aegypti*

SÃO CRISTÓVÃO-SE

2015

GLAUCIENE DA SILVA SANTOS

OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DE SISTEMAS  
ESTABILIZADOS POR TENSOATIVOS CONTENDO ÓLEO  
ESSENCIAL *Syzygium aromaticum* COM POTENCIAL PARA  
CONTROLE LARVICIDA DE *Aedes aegypti*.

Monografia apresentada ao curso de  
Farmácia da Universidade Federal de  
Sergipe como requisito parcial à  
obtenção do título de Bacharel,  
orientado pela professora Dr<sup>a</sup> Rogéria  
de Souza Nunes.

SÃO CRISTOVÃO-SE

2015

GLAUCIENE DA SILVA SANTOS

OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DE SISTEMAS  
ESTABILIZADOS POR TENSOATIVOS CONTENDO ÓLEO  
ESSENCIAL *Syzygium aromaticum* COM POTENCIAL PARA  
CONTROLE LARVICIDA DE *Aedes aegypti*.

Monografia apresentada ao curso de  
Farmácia da Universidade Federal de  
Sergipe como requisito parcial à  
obtenção do título de Bacharel,  
orientado pela professora Dr<sup>a</sup> Rogéria  
de Souza Nunes.

Aprovada em: 05/08/2015.

---

Orientadora: Prof. Dra. Rogéria de Souza Nunes

---

1º Examinador: Mestra em Ciências Farmacêuticas Sarah Guerra Ferreira

---

2º Examinador: Prof. Dr. Victor Hugo Vitorino Sarmento

São Cristóvão – SE

2015

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao senhor DEUS por ter me dado forças para nunca desistir dos meus sonhos e continuar perseverante na luta pelos meus objetivos.

Agradeço aos meus pais Sebastião e Iracema que com muita dificuldade me deram educação e amor, obrigada por tudo que vocês representam em minha vida.

Tenho muito a agradecer a minha filha Hellen Alicia que não tem ideia da enorme alegria que mim oferta todos os dias simplesmente por ser parte de mim, você me dá forças pra não desistir quando as dificuldades aparecem no caminho.

Não posso deixar de homenagear o meu esposo Washington que entrou em minha vida no início do curso, sua presença foi de fundamental importância para chegar até aqui, você me apoiou em tudo sempre disposto a ajudar sendo um excelente pai para Alicia, um amigo de todas as horas obrigadas por fazer parte de minha vida.

Agradeço a minha orientadora Dra. Rogéria de Souza Nunes por ser uma grande profissional, um exemplo a ser seguido. Obrigada por sua sabedoria e inteligência transmitida.

À minha querida co - orientadora Sarah Guerra que foi de fundamental importância para realização desse sonho. Muito obrigada por suas orientações e por estar sempre atenta a ouvir minhas reclamações e dúvidas, a qual estava sempre disposta a saná-las.

Obrigada aos professores e a amigos que obtive nessa jornada, aos colegas do laboratório de farmacotécnica que muitas vezes me ajudaram de alguma forma nesses anos de luta.

Muitíssimo obrigada a minha colega de trabalho Esterlita S. Leite que muitas vezes mim ajudou no trabalho sempre que precisei faltar. Sem a sua ajuda ficaria muito mais difícil a conclusão desta etapa em minha vida.

Muito obrigada a todos que fazem parte de minha vida, que muitas vezes fiquei ausente obrigada pela compreensão de vocês.

É fácil trocar as palavras,  
Difícil é interpretar os silêncios!  
É fácil caminhar lado a lado,  
Difícil é saber como se encontrar!  
É fácil beijar o rosto,  
Difícil é chegar ao coração.  
(Fernando Pessoa).

## RESUMO

A dengue é uma doença infecciosa aguda transmitida pelo vetor *Aedes aegypti*. O número de casos registrados no Brasil e no mundo vem aumentando devido à resistência adquirida pelo vetor aos inseticidas convencionais. O óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (OESA), tem despertado interesse devido a sua atividade contra as larvas do *Aedes aegypti*. No entanto a baixa solubilidade do óleo em meio aquoso representa uma limitação sendo, necessário a utilização de tensoativos (procetyl) e co -tensoativo (ácido oleico) os quais diminuíram a tensão interfacial e favoreceram a dispersão do óleo no meio aquoso desta forma favorecendo a dispersão do OESA em meio aquoso e melhorando sua atividade biológica. Portanto o objetivo desse trabalho foi obter e caracterizar o sistema nanoestruturados contendo OESA estabilizados por tensoativos, a fim de favorecer a dispersão do OESA em meio aquoso e aprimorar sua atividade biológica. Os sistemas foram caracterizados através das técnicas de microscopia de luz polarizada (MPL), Espalhamento de raio X à baixo ângulo (SAXS) e análise reológica. Os sistemas obtidos foram caracterizados como microemulsões, percussores de fases e cristais líquidos de fase lamelar. Os quais foram sugerida uma retenção dos componentes do óleo nos nanosistemas para facilitar a dispersão e liberação controlada protegendo-o de fatores externos.

**Palavras-chave:** Dengue, óleos essenciais, sistemas estabilizados por tensoativos, microemulsões, cristais líquidos.

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS.

Ae	<i>Aedes aegypti</i>
A /O	Água/óleo
A°	Angstron
CL	Cristal Líquido
CG	Cromatografia Gasosa
CLAE	Cromatografia de Alta Eficiência
CO <sub>2</sub>	Gás carbono
DENV	Vírus da Dengue
EM	Emulsão
EHL	Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo
FDH	Febre Hemorrágica de Dengue
He	Gás Hélio
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Sincrotron
KPa	Quilo Pascal (unidade internacional de medidas )
MLP	Microscopia de Luz Polarizada
MIN	Minuto
ML	Mililitros
OE	Óleo Essencial
OESA	Óleo Essencial <i>Syzygium Aromaticum</i>
PPM	Partes por Milhões
(P)	Densidade de Massa
(Pt)	Densidade da Substância
%	Porcentagem
PNCD	Programa Nacional de Controle da Dengue
PPG-5	Procetyl
SVS	Secretaria de Vigilância Sanitária
SF	Separação de Fases
SAXS	Espalhamento de Raio x a Baixo Ângulo
TR	Tempo de Retenção
UFS	Universidade Federal de Sergipe
U/S	Unidade por Segundos

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Composição centesimal das amostras selecionadas do diagrama Procetyl :AO 2:1/OESA/Água.....	27
<b>Tabela 2.</b> Teor dos componentes identificados através da cromatografia gasosa.....	29
<b>Tabela 3.</b> Valores de <i>q Max.</i> e a razão entre os valores de <i>q Max.</i> para as amostras E1 1:9 a E1 5:5.....	34

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mosquito <i>Ae. aegypti</i> .	11
<b>Figura 2.</b> Representação esquemática de ME O/A, bicontínua e A/O (Adaptado de Cunha Júnior <i>et al.</i> , 2002).	16
<b>Figura 3.</b> Representação de um diagrama de fases ternário dos componentes A, B e C a temperatura constante. O ponto X apresenta 40% de A, 50% de B e 10% de C.	19
<b>Figura 4.</b> Tipo de cristal líquido. Adaptado de Lawrence; Rees, 2012; Shah et al., 2001 e Ferreira <i>et al</i> ;2014	20
<b>Figura 5.</b> Cromatograma CG/EM do OESA. 1- Eugenol, 2- $\beta$ -cariofileno, 3- e $\alpha$ - humuleno, 4- Acetato de chavibetol	29
<b>Figura 6.</b> Cromatograma CG/FID do OESA. 1- Eugenol, 2- $\beta$ - cariofileno, 3- e $\alpha$ - humuleno, 4- Acetato de chavibetol.	29
<b>Figura 7.</b> Diagrama pseudoternário Procetyl:AO 2:1/ OESA/ Água. ME: microemulsão, CL: cristal líquido, EM: emulsão e SF: separação de fases.	30
<b>Figura 8.</b> Imagem obtida por microscopia de luz polarizada, representando a isotropia das formulações E1 1:9 (a); E1 2:8 (b).	31
<b>Figura 9.</b> Imagem obtida por microscopia de luz polarizada, representando a anisotropia das formulações E1 3:7 (c); E1 4:6 (d).	31
<b>Figura 10.</b> Imagem obtida por microscopia de luz polarizada, representando a anisotropia das formulações E1 5:5 (e).	31
<b>Figura 11.</b> Curva de SAXS das amostras do Ensaio E1 1:9 a E1 5:5.	34
<b>Figuras 12.</b> Representando análises reológicas das amostras.	36



## SUMÁRIO

<b>1.Introdução.....</b>	<b>10</b>
<b>2. Revisão de Literatura.....</b>	<b>11</b>
2.1.Dengue.....	12
2.Óleos Essenciais .....	14
2.3. Óleo Essencial de Cravo .....	15
<b>2.4. Sistemas Estabilizados por Tensoativo .....</b>	<b>16</b>
2.4.1. Transição de Fases.....	19
2.4.2. Microemulsão.....	20
2.4.3 Cristais Líquidos.....	21
<b>3.Objetivos .....</b>	<b>24</b>
3.1. Objetivo Geral.....	24
3.2. Objetivos Específicos .....	24
<b>4. Metodologia .....</b>	<b>25</b>
4.1. Extração do Óleo Essencial de Syzygium Aromatic.....	25
4.1.1.Cálculo da Densidade .....	25
4.1.2. Identificação dos Constituintes Químicos do OESA.....	26
4.2. Obtenção dos Sistemas através de Diagrama de Fases .....	26
4.3. Microscopia de Luz Polarizada .....	27
4.4. Espalhamento de Raios X a Baixo Ângulo (SAXS) .....	27
4.5. Reologia .....	27
<b>5. Resultados e Discussão .....</b>	<b>28</b>
5.1. Extração do Óleo Essencial de Sizzyguim Aromaticum. ....	28
5.1.1. Cálculo da Densidade .....	28
5.1.2. Identificação dos Constituintes Químicos do OESA .....	29
5.2. Obtenção do Diagrama de Fases .....	29
5.3. Microscopia de Luz Polarizada .....	31
5.4. Espalhamento de Raios x a Baixo Ângulo (SAXS) .....	33
5.5. Reologia .....	35
<b>6. Conclusão .....</b>	<b>38</b>
<b>7. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>39</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A dengue é uma enfermidade causada por um arbovírus da família Flaviviridae, do gênero Flavivírus, é transmitida por picadas da fêmea de mosquitos do gênero *Aedes* infectada pelo vírus e está presente nas regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo (WHO.; 2013). Segundo a Organização Mundial (OMS) estima-se que existem mais de 80 milhões de pessoas infectadas por ano cerca de 550 mil internações e 20 mil mortes anual (GUZMAN *et al.*; 2010). A dengue é uma doença de notificação compulsória, aguda com características clínicas, variando desde quadros febris inespecíficos até manifestações graves como hemorragia e choque hemorrágico, que incide principalmente nas épocas mais quentes do ano. (BRAVA *et al.*; 2007).

Contudo, existem no mercado quatro classes de inseticidas que são amplamente utilizadas como método químico de erradicação do vetor, a exemplo dos organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides, porém o uso dessas classes está ameaçado com a eminente resistência dos vetores causando o aumento da toxicidade aos seres humanos levando a sérios problemas de saúde (RANSON *et al.*; 2010, NKYA *et al.*; 2012).

Contudo os produtos naturais como os óleos essenciais vêm sendo amplamente estudados como alternativa ao controle larvicida da dengue. Os óleos essenciais são extraídos de plantas frescas ou secas mediante hidrodestilação, destilação por vapor de água, fluido supercrítico, prensagem, entre outras (BRAGA *et al* 2007).

O óleo essencial *syzygium aromaticum* (OESA) apresenta baixa solubilidade em água e são facilmente oxidados. Ele apresenta ação antifúngica, antiinflamatória, analgésica e pronunciada atividade larvicida (AFFONSO *et al* 2012).

Devido às limitações observadas para uso direto em meio aquoso, tem sido avaliado o uso de sistemas estabilizados por tensoativos do tipo micro e nano emulsionados assim como as mesofases cristalinas (cristais líquidos).

Ferreira, e colaboradores (2015) em seu trabalho, avaliaram o desempenho de sistemas precursores de fase líquido cristalino contendo óleo essencial de *Citrus sinensis*. Estes sistemas se mostraram eficientes como carreadores para o óleo, assim como apresentaram desempenho satisfatório frente ao efeito larvicida contra larvas de *Aedes aegypti*. Foi observada a viabilidade da estruturação *in situ* a partir das transições estruturais sendo sugeridos como promissores para o controle larvicida do *Aedes aegypti* (FERREIRA *et al.*; 2014).

Desta forma com base nas premissas, o presente trabalho foi desenvolvido com o intuito de obter sistemas nanoestruturados contendo óleo essencial *Syzygium aromaticum*, caracterizar estes sistemas estruturalmente para avaliar o potencial de formação de precursores de mesofase líquido cristalino com potencial para aplicação no controle químico das larvas do *Aedes aegypti*.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. DENGUE**

Durante o Século XIX, a dengue foi considerada uma doença esporádica. Hoje, é considerada uma das mais importantes doenças virais do mundo, transmitida pelo vetor do *Aedes aegypti*. Nos últimos 50 anos, a incidência aumentou 30 vezes. Mais de 50 milhões de casos de infecções ocorrem anualmente, com 500 mil casos de febre hemorrágica de dengue e 22 mil mortes, principalmente em crianças no mundo (M.S, 2015). Uma pandemia em 1998, na qual 1.2 milhão de casos de dengue clássica e febre hemorrágica de dengue foram relatadas em 56 países de todo o mundo. O desafio para as agências nacionais e internacionais da saúde é reduzir a tendência do aumento da atividade epidêmica da dengue e do aumento da incidência da febre hemorrágica de dengue (MACIEL *et al.*; 2008).

Nos últimos dez anos os casos mais graves e o número de óbitos de dengue tiveram um aumento significativo necessitando de maior atenção do MS e da sociedade em geral. A detecção precoce é de vital importância para a tomada de decisões, evitando a ocorrência de óbitos. A infecção pelo vírus da dengue causa uma doença de amplo espectro clínico, incluindo desde formas graves até quadros que podem evoluir para o óbito (CAVALCANTI *et al.*; 2011).

Até o primeiro trimestre de 2015, foram registrados mais de 4,5 mil casos da dengue no Brasil. A Região Sudeste foi responsável por 70,1% das notificações, o que corresponde a 3.150 pessoas infectadas (MS, 2015). No estado de Sergipe, até o quarto mês desse ano, foram notificados 2.789 e 759 confirmados (MS, 2015). No primeiro trimestre de 2014 foram registrados cerca de 90 mil casos, aumento de quase 80% quando comparado ao mesmo período no ano de 2013 (MS, 2014).

O vírus da dengue pertence ao gênero *Flavivirus* e à família *Flaviviridae*. É um vírus RNA, de filamento único, envelopado e que possui quatro sorotipos: DENV-I, DENV-II, DENV-III, DENV-IV (SIRISEN *et al.*; 2013). A dengue é uma doença aguda, que causa febre de evolução favorável na forma clássica e grave quando se apresenta na forma hemorrágica. Os sintomas da dengue clássica são: cefaleia, dor

retrorbital, mialgia, artralgia, prostração, exantema. Já a febre hemorrágica de dengue – (FHD) é todo caso suspeito de dengue severa que apresente também manifestações hemorrágicas, que podem variar desde a prova do laço positiva até fenômenos mais graves como hemorragias, plaquetopenias, hematêmese, melena entre outros. (FONSECA *et al.*;2012).

O *Aedes aegypti* tem hábito diurno, principalmente no início da manhã e no final da tarde; tem preferência por ambientes urbanos e intradomiciliares; e alimenta-se principalmente de sangue humano (FONSECA *et al.* ; 2012, SIRISEN *et al.* ;2013).



**Figura 1.** Mosquito *Ae. Aegypti* CDC 2012.

De acordo com o Ministério da Saúde, a dengue não possui tratamento medicamentoso específico. Os medicamentos são utilizados apenas para amenizar os sinais e sintomas, controlando a dor e baixando a temperatura corpórea em casos de febre. Essas indicações favorecem a automedicação, principalmente durante o verão, em que ocorrem tanto casos de dengue, quanto outras viroses infantis (MS, 2015).

Assim, a melhor forma de prevenção da doença continua sendo pelo controle do seu vetor. Para isso, é fundamental o esclarecimento da sociedade para que ela atue juntamente aos órgãos públicos, já que o principal local onde são encontrados os mosquitos da dengue é dentro dos domicílios e peridomiciliar.

As atuais pesquisas para o desenvolvimento de vacina e de mosquitos transgênicos, o mais recente estudo anunciado pela Fiocruz em parceria com a Universidade de Monash (Austrália) que utiliza uma bactéria conhecida como *Wolbachia* para bloquear a transmissão do vírus da dengue pelo mosquito *Ae. aegypti*. Segundo os pesquisadores, esta é uma técnica autossustentável e sem prejuízos ao meio ambiente (FONSECA *et al.* ;2012).

O controle químico consiste no uso de substâncias químicas inseticidas nas fases de larvas e adultas do *Aedes aegypti* (MS 2015). Os inseticidas devem ser seguros ,custo

efetivo relativamente alto ,além de causar toxicidade ao meio ambiente e principalmente ao homem. Desse modo as intervenções químicas só devem ser feitas em caso em casos necessários (WHO, 2013).

Quatro classe de inseticidas são amplamente utilizados, os organofosforados ,organoclorados ,carbamatos e piretróides , porém o uso dessas classes estão ameaçados com a resistência dos vetores (NKYA ,2012) .

Devido à resistência aos produtos intensamente utilizados, o uso de produtos naturais surge como uma alternativa para o controle químico. Luna e colaboradores (2004) avaliaram a susceptibilidade do *Aedes. aegypti* aos inseticidas químicos, temephós e cipermetrina. Os resultados mostraram que o *Aedes aegypti* é suscetível a temephós e apresenta resistência a cipermetrina. Resultados semelhantes aos encontrados por Campos e colaboradores (2001) e Carvalho e colaboradores (2004), demonstrando a necessidade de implementar medidas alternativas de controle.

A toxicidade de uma substância química para insetos não a qualifica necessariamente como praguicida. Para tal, devem estar associadas várias propriedades a esta atividade, como: eficácia em pequenas concentrações, baixa toxicidade para mamíferos e animais superiores, ausência de fitotoxicidade e baixa biodegradabilidade (AFONSO *et al.*,2010).

As investigações a respeito da utilização de óleos essenciais como potenciais candidatos ao controle do *Ae. aegypti* vem se intensificado. Carvalho e colaboradores (2004) mostraram em seus estudos que o óleo essencial (OE) da *Lippia sidoides* possui uma pronunciada atividade larvicida sobre o *Aedes aegypti*, causando uma mortalidade quase instantânea.

Silva e colaboradores (2008) demonstrou um potente efeito larvicida da *Lippia gracillis* contra o referido mosquito, sendo este efeito atribuído à contribuição efetiva de seus componentes majoritários (carvacrol e o óxido de cariofileno). Costa (2010), Santos (2012) e Silva (2012) avaliaram o OE de *Citrus ssinensis*(L) Osbeck OECS (laranja pêra), demonstrando seu efeito larvicida contras as larvas do referido mosquito. Costa e colaboradores (2005) avaliaram o efeito dos OEs *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzygium aromaticum*, onde os três apresentaram valores de CL50 bastante.

## 2.2. ÓLEOS ESSENCIAIS

Os OEs são líquidos lípidos, voláteis, de caráter lipofílico raramente colorido, compostos por misturas complexas de substâncias orgânicas odoríferas, refringentes, e formam-se num grande número de plantas como subprodutos do metabolismo secundário (BAKKALI *et al.* ;2008). Desempenham a função de proteção nas plantas através de suas características aromáticas. Apresentam complexa composição química, sendo compostos geralmente por um número de 20 a 60 componentes em concentrações distintas, prevalecendo dois ou três em concentrações relativamente elevadas (20-70%), que na maioria das vezes determinam as propriedades biológicas dos OEs (BAKKALI *et al.*; 2008). Os OESA podem apresentar propriedades antissépticas, antimicrobiana, antiviral, anti-inflamatória, analgésica, antioxidante, inseticida e larvicida (BUCHBAVER, 2010; CAVALCANTI *et al.*; 2011).

Segundo Simões *e colaboradores*, (2004) os óleos essências, podem ser definidos como misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, com características odoríferas, sabor acre (ácido) e consistência oleosa. Possuem atividade óptica e índice de refração, sua coloração pode ser levemente amarelada ou até incolor e quando recém-extraídos, porém podem apresentar uma baixa estabilidade na presença de luz, calor, ar e umidade.

São conhecidos aproximadamente 3000 óleos essenciais, os quais podem apresentar diversas atividades biológicas, como antimicrobiana, antineoplásica, antiviral, anti-inflamatória, analgésica, antioxidante, inseticida e larvicida (BUCHBAUER, 2010; CAVALCANTI *et al.* ;2004). Destes, 300 são utilizados nas indústrias de medicamentos, alimentos, produtos de limpeza, perfumes e cosméticos (BAKKALI *et al.*;2008).

O Brasil se destaca na produção de OE, ao lado da Índia, China e Indonésia, que são considerados os quatro grandes produtores mundiais. A posição do Brasil deve-se aos OE de cítricos, que são subprodutos da indústria de sucos. No passado, o país teve destaque como exportador de OE de pau rosa, sassafrás e menta. Nos dois últimos casos, passou à condição de importador.

## 2.3. ÓLEO ESSENCIAL (*Syzygium aromaticum*) OESA.

O OE de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry (OESA) é obtido a partir dos botões florais secos do cravo da índia (CHAIEB *et al.*; 2007). Pertence à família das mirtáceas (Myrtaceae). Seu componente majoritário é o Eugenol (4-Allyl-2-

methoxyphenol), apresentando-se em 80-90% do total do OE e outros componentes em menores proporções como  $\beta$ - cariofileno, acetato de eugenila, entre outros (CHAIEB *et al.*;2007; COSTA *et al.*.; 2005; SÁNCHEZ *et al.*;2012).

O OESA é tradicionalmente usado no atendimento odontológico, como um antisséptico e analgésico para o tratamento da dor de dente. Ele é ativo contra bactérias orais associadas à cárie dental e em doenças periodontais (AFFONSO *et al.*.;2012). Sendo eficaz contra um grande número de outras bactérias: *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella entérica* (FRIEDAM *et al.*; 2002), *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enteritidis* e *Staphylococcus aureus* (BEUCHAT, 2000; CRESSY *et al.*, 2003; KALEMBA & KUNICKA, 2003).

Devido à volatilidade dos constituintes do óleo essencial, a principal técnica analítica utilizada para a quantificação dos constituintes é a cromatografia com fase gasosa (CG) com detector de chama (DIC); o CG com detector de massas (EM) é usado na identificação dos constituintes presentes. Entretanto, MAZZAFERA (2006), utilizou a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a determinação especificamente do eugenol.

O óleo também apresenta atividade larvicida contra o *Aedes aegypti* (COSTA *et al.*; 2005). Foi detectada a atividade acaricida e larvicida do eugenol contra o *Aedes aegypti* (CL50 de 44,5 ppm) e também do extrato aquoso de *S. aromaticum*, atingindo um nível de repelência de 60 a 80% contra o vetor (*Cosmopolites sordidus* Germar). Outro estudo mostra as atividades inseticidas do *S. aromaticum* contra *Pediculus capitis*, *Culex pipiens*, *Tribolium castaneum*, *Sitophilus zeamais*, *Dermatophagoides farinae*, *D. Pteronyssinus*, *Psoroptes Cuniculi* e cupins japoneses (AFFONSO *et al.*; 2012).

Em função disso, Trongtokit e colaboradores verificaram, ao testar a atividade repelente de 38 óleos essenciais contra *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* e *Anopheles dirus*, que o *S. aromaticum* foi um dos mais eficazes nas concentrações mais altas contra o *Aedes aegypti*. Entretanto, sua eficácia mostrou-se comparativamente maior para as espécies *C. quinquefasciatus* e *A. dirus* (GUAN WENQIANG *et al.*.; 2006).

Em laboratório, o OESA pode ser extraído por destilação simples, mas para a produção em larga escala o processo de extração mais utilizado atualmente é a destilação por arraste a vapor. Todavia o óleo pode também ser obtido por extração com solvente ou extração por CO<sub>2</sub> supercrítico (AFONSO *et al.*;2012).Atualmente , no

Brasil o grande polo produtor de cravo da Índia encontra-se na Bahia, principalmente na região do baixo sul, em cidades como Valença, Ituberá, Taperoá, Camamu e Nilo Peçanha (AFFONSO *et al.*; 2012).

## **2.4.SISTEMAS ESTABILIZADOS POR TENSOATIVOS**

### **2.4.1. Precursores de Fases**

Mueller-Goymann; Hamann (1993) abordaram pela primeira vez o conceito de transição de fase *in situ*, e em seu estudo observaram que soluções micelares reversas como veículo para o fármaco lidocaína sofreram transição de fase para um sistema de CL após entrar em contato com água, que demonstrou uma taxa de liberação sustentada. Os precursores de fase são sistemas sensíveis a estímulo, que apresentam transição de fase em resposta a algum estímulo físico ou químico, como alterações na temperatura, pH, força iônica, conteúdo aquoso, etc. (WEI *et al.*; 2002).

Esses sistemas são utilizados quando a fase que é almejada apresenta alguma limitação quanto ao seu uso convencional, como dificuldade de aplicação (CARVALHO *et al.*; 2013; MAGHRABY, 2010; REN *et al.*; 2012).

### **2.4.2.MICROEMULSÃO**

Segundo Danielsson e Lindman (1981) as microemulsões são dispersões líquidas isotrópicas, transparentes, termodinamicamente estáveis, usualmente formadas por água, óleo, tensoativo e/ ou co-tensoativo. Apresentam grande potencial como sistemas de liberação de substâncias bioativas, pelas propriedades de solubilizar substâncias hidrofílicas em meio lipofílico ou lipofílica em meio aquoso e anfifílico na interface óleo/ água (DAMASCENO *et al.*; 2010).

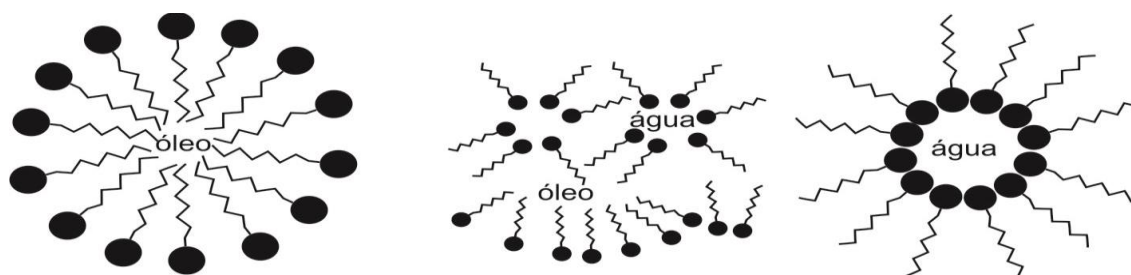
A formação de microestruturas em soluções aquosas de tensoativos é um fenômeno comum de auto-organização molecular como forma de atingir a estabilidade termodinâmica. Esse fenômeno torna-se a base para a aplicação tecnológica dos tensoativos como sistemas organizados nas ciências biológicas. Moléculas de tensoativos comumente se autoagregam na presença de água formando uma rica variedade de estruturas, quando são variados os parâmetros de concentração de tensoativos, presença de sal ou a temperatura. (FORMARIZ *et al.* ; 2006).

Em soluções diluídas, soluções isotrópicas de agregados micelares podem ser formadas, enquanto que em sistemas tensoativo - solvente em concentrações mais



elevadas, fases líquido-cristalinas isotrópicas e anisotrópicas podem existir (FORMARIZ *et al.*; 2006).

Esses agregados tornam-se mais estruturados quando um óleo ou mesmo outros componentes, como outro tensoativo ou um álcool de cadeia média, é adicionado ao sistema tensoativo - água. Dessa forma, emulsões, microemulsões e mesofases liotrópicas de diferentes geometrias podem ser geradas (FORMARIZ *et al.*; 2006; KAWAKAMI *et al.*; 2002; KAWAKAMI *et al.*; 2002b; SILVA *et al.*; 2010; TENJARLA, 1999).



**Figura 3.** Representação esquemática de ME O/A, bicontínua e A/O (Ferreira *et al.*, 2014).

A mistura de componentes de diferentes polaridades, com diferentes constantes dielétricas, como óleo e água, na presença do tensoativo, agregam-se de tal forma a possibilitar diferentes regiões adicionais de solubilização (KREILGAARD; 2002).

Essa propriedade possibilita compartimentalizar a substância ativa, podendo direcioná-los para os sítios onde deveram exercer o efeito, além de poder controlar a velocidade de liberação, sem alterar a estrutura química da molécula transportada, sendo considerados, portanto sistemas reservatórios. Nestes tipos de sistemas, as substâncias ativas encontram-se separadas do meio de dissolução através de um revestimento, uma membrana, ou uma interface, devendo transpor essa barreira para ser liberado do meio (CHIVAS *et al.*; 2009).

As microemulsões (ME) e os Cristais Líquidos (CL) são sistemas reservatórios, nos quais a face interna constitui um microambiente restrito, com propriedades particulares, podendo ligar ou associar a moléculas com diferentes polaridades (OLIVEIRA *et al.*; 2004).

A principal característica desses sistemas é formar uma emulsão muito fina por homogeneização suave com fase aquosa, cujas dimensões das gotículas da fase interna são da ordem de nanômetros. As ME são superiores às soluções micelares em termos de potencial de solubilização de substâncias, por isso, são usadas para aumentar a

solubilização e a absorção de substâncias ativas lipofílicas. Sua estabilidade termodinâmica oferece vantagens sobre as dispersões instáveis, tais como as suspensões e emulsões, possuindo tempo de vida útil muito mais amplo (MACEDO *et al.*; 2006).

Correa e colaboradores (2005) mostraram que a viscosidade aparente de sistemas microemulsionados e emulsionados é dependente do volume e da natureza da fase oleosa, visto que o aumento do volume de fase interna oleosa provocou aumento da viscosidade aparente e que microemulsões com estruturas bicontínuas apresentam valores de viscosidade mais baixos.

Todavia, quando as substâncias bioativas são incorporadas em sistemas microemulsionados, o transporte é maior do que em cristais líquidos. Esse fato pode ser atribuído às diferenças estruturais desses sistemas, os quais restringem o movimento das moléculas da substância ativa, e às interações soluto-solvente no ambiente anisotrópico e isotrópico, visto que os cristais líquidos apresentam alta energia de ativação de difusão e baixa difusividade de substância ativa (GABBOUN *et al.*; 2001 ;SILVA *et al.* ;2012).

O tensoativo pode ser puro, uma mistura, ou combinação com outros componentes, cuja principal função é a redução da tensão interfacial (CRUZ, UCKUN, 2001). Para a formação espontânea dos sistemas microemulsionados, a tensão interfacial deve estar próxima de zero. Esse sistema apresenta algumas vantagens tais como transparência, alta estabilidade, fácil preparação e capacidade de incorporar diferentes classes de fármacos e substâncias ativas com diferentes propriedades físico-químicas. Esse fenômeno comum de auto-organização molecular para atingir a estabilidade termodinâmica é a base para a aplicação tecnológica dos tensoativos como potencial sistema de liberação de fármacos (ABOOFAZELI *et al.*; 2000.; CHIVAS *et al.* ;2009).

Um único tensoativo geralmente não é suficiente para formar uma ME, e se faz necessário a combinação com um cotensoativo, que altera a capacidade do tensoativo para formação de ME (DJEKIC *et al.*; 2011).

A adição do co-tensoativo reduz a energia livre na interface e tensão através da penetração no filme de tensoativo, como também alteram o valor do EHL para um valor ótimo e adequado para formação de MEs (DAMASCENO *et al.*; 2011; FORMARIZ *et al.*;2005).

A natureza e estrutura do tensoativo, co -tensoativo e óleo essencial são fatores essenciais na formulação de sistemas microemulsionados. Os tensoativos não iônicos são os mais aplicados no desenvolvimento de sistemas de liberação substâncias ativas, contudo a concentração micelar crítica (CMC) é geralmente muito menor que dos

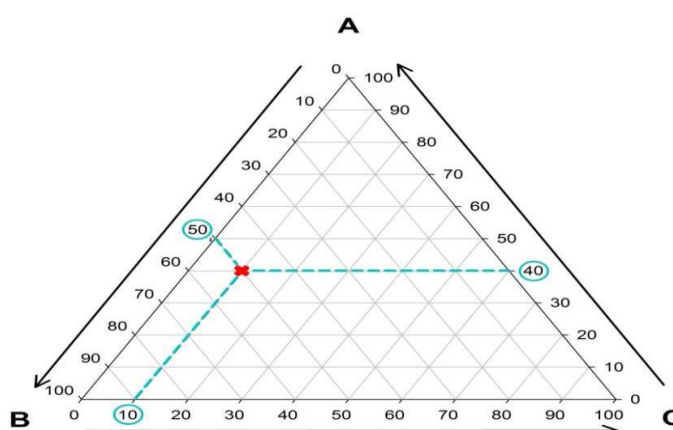
tensoativos ionicamente carregados, e por isso são menos irritantes e mais tolerados.(CHIVAS *et al.*;2009).

Os tensoativos empregados neste trabalho foram do tipo álcool graxo etoxilado e propoxilado,cujo INCI (*International Nomenclature of Cosmetic Ingredient*) é PPG-5-CETETH-20 conhecido por nome comercial Procetyl , apresenta-se como líquido incolor, odor leve característico, equilíbrio hidrófilo lipófilo , EHL =16 pH (solução aquosa 3%, 25 ° C) = 5,5-7,5, densidade relativa = 1,050 e completamente solúvel em água e etanol. Não é irritante para pele (CRODA, 2002, CHIVAS *et al.* ;2009).

O ácido oleico é um óleo líquido incolor, insolúvel em água, obtido pela hidrólise de óleos vegetal e animal, e com densidade relativa de 0,895g/ml. Na presença de ar, oxida-se e adquire coloração amarela e odor rançoso (MERCK, 1996). É conhecido como agente de permeação (MARTINDALE, 2007), e já foi utilizado com esta finalidade em sistemas de liberação transdérmica do AZT incorporado em gel de hidroxipropilmetilcelulose (NARISHETTY; PANCHAGNULA, 2004).

#### 2.4.3. DIAGRAMA DE FASES

Os diagramas de fases ternários ou pseudoternários podem ser obtidos a partir de dados de titulação ou pela preparação de amplo número de amostras com diferentes proporções dos componentes. A construção de diagrama de fases é uma ferramenta ideal para caracterizar o domínio das regiões de ME, cuja interpretação descreve as estruturas presentes contidas neles, podendo-se escolher a região cuja viscosidade é mais apropriada para incorporação de substância ativa (SILVA *et al.*; 2009).



**Figura4.** Representação de um diagrama de fases ternário dos componentes A, B e C a temperatura constante. O ponto X apresenta 40% de A, 50% de B e 10% de C.(Ferreira *et al.* ; 2014).

Em 1946, DAHL, em seu estudo sobre cristalização, foi um dos primeiros pesquisadores a estudar e interpretar o diagrama de fases (MACEDO *et al.*; 2008). Os diagramas de fases ternários e pseudoternários são geralmente construídos em duas dimensões a partir de dados obtidos por titulação ou pela preparação de um amplo número de amostras de diferentes composições.

A vantagem do primeiro método é que este pode ser usado para estudar um amplo número de amostras de diferentes composições de uma maneira mais rápida, indicando as proporções nas quais os componentes devem ser misturados (LAWRENCE *et al.*; 2000). Além disso, as várias formas encontradas no sistema podem ser identificadas qualitativamente pela comparação com estudos prévios na literatura (BAKER *et al.*; 1984).

Normalmente, os sistemas microemulsionados podem ser diferenciados visualmente dos outros sistemas, uma vez que os demais sistemas apresentam como emulsões líquidas opacas, emulsões géis opacos, representadas por sistemas de viscosidade elevada, ou com separação de fases. Já os sistemas microemulsionados líquidos são caracterizados como sistemas translúcidos ou opticamente transparentes. (FORMARIZ *et al.*; 2005). Estes são geralmente caracterizados como agregados esféricos e com diâmetros menores que 1400 nm, geralmente de 100 Å (LANGEVIN, 1988; OLIVEIRA, SCARPA, 2001; OLIVEIRA *et al.*; 2004).

A determinação da densidade, viscosidade, espalhamento de luz, índice de refração são importantes como técnicas de caracterização física das ME e CL (CONSTANTINIDES *et al.*; 1995). A literatura refere que técnicas experimentais diferentes podem ser usadas para obter informações sobre a dinâmica e estrutura das MEs (KAHLWEIT *et al.*; 1987). Diferenças de viscosidade podem diferenciar sistemas microemulsionados comuns de sistemas géis.

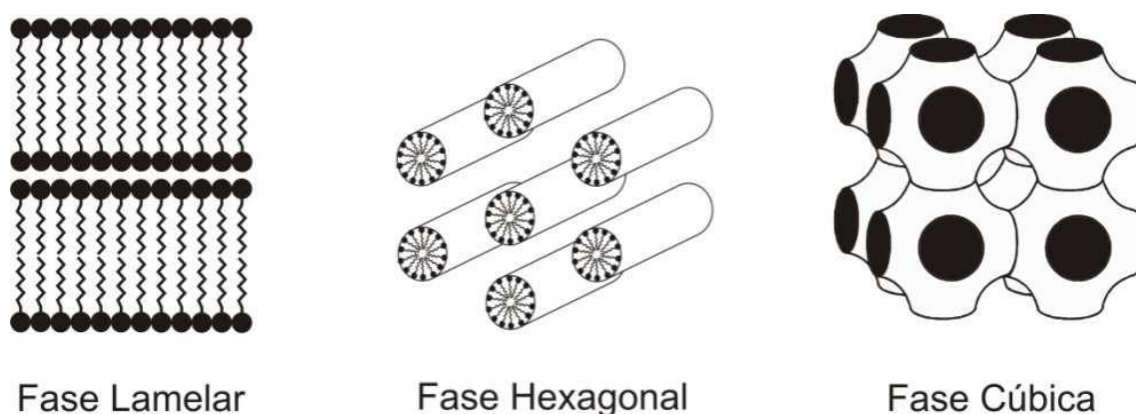
Gotículas de fase interna com tamanhos extremamente pequenos são característica de sistemas termodinamicamente estáveis se esses formarem espontaneamente, mas o aumento do diâmetro com o volume de fase interna, geralmente, leva à modificação da microestrutura interna do sistema, na qual a estrutura esférica das gotículas modifica-se para fases hexagonais e contínuas (CONSTANTINIDES *et al.*, 1995; OLIVEIRA, 1997; AVRAMIOTIS *et al.*; 1997).

#### 2.4.4. CRISTAIS LÍQUIDOS

Os Cristais líquidos constituem uma fase distinta de estruturas condensadas, cujas características físicas os posicionam entre sólidos e fundidos, com parcial ordem/desordem das espécies atômicas (HYDE *et al.*; 2001).

Materiais que formam cristais líquidos pela adição de solventes são chamados cristais líquidos liotrópicos, enquanto cristais líquidos termotrópicos têm sua estabilidade dependente da temperatura (FORMARIZ; 2005, URBAN, 2004; TROTTA *et al.*; 1996; CARVALHO *et al.*; 2009).

Os CLs são também chamados de mesofases e apresentam estruturas unidimensionais, bidimensionais ou tridimensionais em escala nanométrica, organizados em fases que podem variar de lamelar, hexagonal ou cúbica, respectivamente conforme o aumento da concentração de tensoativo (HYDE, 2001). As mesofases liotrópicas podem ser consideradas micelas ordenadas com arranjo molecular caracterizado por regiões hidrofóbicas e hidrofílicas alternadas.



**Figura 5.** Tipo de cristal líquido. (Ferreira *et al* 2014).

Dependo da temperatura e da concentração dessas moléculas de tensoativos em água, formam-se agregados bem estruturados, tais como cúbicas, hexagonais e lamelares (BRINON *et al.*; 1999; FARKAS *et al.*; 2001, GABBOUN *et al.*; 2001).

A fase lamelar é formada por camadas paralelas e planas de bicamadas de tensoativos separadas por camadas de solventes formando uma rede unidimensional. (EZRAHI *et al.*; 1999). Já as mesofases hexagonais consistem em um denso empacotamento de micelas cilíndricas, arranjadas em uma estrutura bidimensional.

As fases cúbicas exibem uma organização espacial mais complexa dos cristais líquidos. São caracterizados por uma camada lipídica bi contínuo por onde passam canais aquosos em escalas monoméricas, formando estruturas tridimensionais e não

transmitem luz. As mesofases são geralmente formadas pela presença de tensoativos da classe dos polioxietilenos, polímeros e lipídeos, como mono e triglicerídeos (GABBOUN *et al.*, 2001; HYDE, 2001).

Dentre os lipídios mais utilizados na composição desses sistemas, estão a monoleato de glicerila (monoleína) e o monolinoleato de glicerila (NORLING *et al.*, 1992; CARR *et al.*, 1997; CHANG, BODMEIER, 1997; LEE, KELLAWAY, 2000; URBAN, 2004).

Os cristais líquidos liotrópicos são formadas por moléculas de surfactante que têm uma região polar e outra não-polar. Em ambientes aquosos, eles formam monocamadas com o grupo polar virada para a água e, depois de ter atingido uma concentração micelar crítica, agregados chamados micelas são formadas. A estrutura das micelas pode variar de acordo com a geometria das moléculas e a quantidade relativa de cada componente (CHIVAS *et al.*; 2012).

Eles também são termodinamicamente estáveis e podem ser armazenada por longos períodos de tempo, sem separação de fases. Devido à sua alta organização estrutural em nanoescala e uniforme, as fases de cristal líquido exibem propriedades que favorecem a solubilização de drogas em solução aquosa, compartimentos oleosos ou anfifílicos. Além disso, eles podem ser usados para formar uma matriz de liberação do fármaco e substâncias ativas rígidas que podem ser utilizadas para administração de medicamentos de controle (CHIVAS *et al.*; 2012).

Sistemas com elevada viscosidade, também podem conter erros experimentais no tamanho das gotículas (ABOOFAZELI *et al.*; 2000), em razão de que a técnica de determinação é fundamentada no movimento Browniano das gotículas em dispersão, sendo o coeficiente de difusão das gotículas no meio, o principal parâmetro levado em consideração (ORTHABER, GLATTER, 2000).

As mesofases líquido-cristalinas podem ser grosseiramente caracterizadas verificando-se a viscosidade. A fase lamelar geralmente apresenta-se como líquido viscoso e a fase hexagonal tem a viscosidade semelhante à de um gel, enquanto que a viscosidade da fase cúbica é extremamente elevada (GABBOUN *et al.*; 2001; HYDE, 2001).

Uma das maneiras de classificar as fases líquidas cristalinas é determinar sua isotropia óptica, através da técnica de microscopia de luz polarizada. Sob um plano de luz polarizada, a amostra é anisotrópica se for capaz de desviar o plano da luz incidente e isotrópica se não desviar a luz. Mesofases lamelares e hexagonais são anisotrópicas,

enquanto as cúbicas são isotrópicas (NORLING *et al.*; 1992; BRINON *et al.*; 1999; HYDE., 2001).

Para análises mais aprofundadas da estrutura das mesofases, disposição das interfaces, tamanho de micelas, existem diversas técnicas mais sofisticadas que são comumente utilizadas, como microscopia eletrônica de criofractura (EZRAHI *et al.*;1999), difração de nêutrons (Hyde, 2001), espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS), espalhamento de nêutrons a baixo ângulo (SANS) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) (FARKAS *et al.*; 2000).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GERAL**

Obter e Caracterizar sistemas nanoestruturados a partir da utilização de água/óleo estabilizados por tensoativo, visando obter um sistema que, ao absorver fluidos aquosos, se converta numa mesofase de alta viscosidade, com potencial aplicação no controle larvicida do *Aedes aegypti*.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Extrair do óleo *Syzygium aromaticum* (OESA) e identificação dos seus componentes através da Cromatografia gasosa em massa, calcular o rendimento e a densidade do óleo obtido;
- Obter as Microemulsões as e mesofases contendo óleo essencial OESA;
- Caracterizar os sistemas através das técnicas de Microscopia de luz polarizada (MLP), Espalhamento de Raio X a baixo ângulo (SAXS) e Análises Reológicas.



## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Extração do Óleo Essencial *Syzygium aromaticum* (OESA)

A extração do OESA foi realizada no Laboratório de Desenvolvimento Farmacotécnico da Universidade Federal de Sergipe utilizando um hidrodestilador Clevenger modificado, através da condensação do óleo após um período de 8 horas, quando submetido a temperaturas abaixo de 60 °C. Os cravos foram obtidos no mercado municipal Albano Franco no centro de Aracaju, Sergipe.

No processo de extração foram utilizados 200 g de cravos da Índia, os quais foram triturados em triturador para aumentar a eficiência da extração. Foram utilizados dois litros de água destilada misturados aos cravos e destilados no balão volumétrico acoplado ao aparelho. Após a completa extração, o óleo foi separado do hidrolato (água aromatizada resultante da extração) através de filtração por funil de separação. Traços de água foram removidos utilizando sulfato de sódio anidro. O OESA foi armazenado em um frasco âmbar devido a sua sensibilidade a luz e conservado na geladeira até a utilização do mesmo.

#### 4.1.1. Cálculo da Densidade

A densidade de massa ( $\rho$ ) de uma substância é a razão de sua massa por seu volume a 20 °C. A densidade de massa da substância ( $\rho_t$ ) em uma determinada temperatura (t) é calculada a partir de sua densidade relativa ( $d_t^t$ ) através da fórmula:

$$\rho_t = d_{\text{água}}^t \times d_t^t + 0,0012$$

Expressa em g/mL ou kg/L.

A densidade relativa de uma substância é a razão de sua massa pela massa de igual volume de água, ambas a 20 °C ( $d_{20}^{20}$ ).

Foi utilizado um picnômetro de vidro de 3 mL, limpo e seco e registrado seu peso vazio. O OESA a 20 °C foi transferido para o picnômetro e seu peso registrado. O peso da amostra foi obtido através da diferença de massa do picnômetro cheio e vazio. A densidade relativa foi calculada ( $d_{20}^{20}$ ) determinando a razão entre a massa da amostra líquida e a massa da água, ambas a 20 °C. Após a determinação da densidade relativa, foi calculada a densidade de massa ( $\rho$ ). Foi utilizada como base de metodologia a Farmacopeia Brasileira.

#### 4.1.2. Identificação dos Constituintes Químicos do OESA

A análise qualitativa da composição química do OESA foi realizada em um cromatográfico gasoso acoplado a um espectrômetro de massas CG- EM, equipado com

um autoinjeter AOC-20i (Shimadzu) e coluna capilar de sílica fundida - J&W Scientific (5%-phenil-95%-dimethylpolisiloxano) - de 30 mm x 0,25 mm i.d., 0,25 µm de filme; usando He como gás de arraste, com fluxo de 1,0 mL/min. A temperatura foi programada mantendo 50°C por 1,5 min, seguido de um aumento de 4°C/min, até atingir 200°C; depois a 10°C/min até atingir 250°C, mantendo constante esta temperatura por 5 min; a temperatura do injetor foi de 250°C e a temperatura do detector (ou interface), de 280°C; foi injetado um volume de 0,5µL em acetato de etila; a taxa de partição do volume injetado foi de 1:83 e a pressão na coluna, de 64,20 kPa. As condições do EM foram: detector de captura iônica operando por impacto eletrônico e energia de impacto de 70V; velocidade de varredura 1000 u/s; intervalo de varredura de 0,50 fragmentos/s e fragmentos detectados na faixa de 40 a 500 Da. A análise foi realizada no Departamento de Química da UFS.

#### **4.2.Obtenção dos sistemas através de diagrama de fases**

Para realização do sistema nano estruturado foi construído um diagrama de fases pseudoternário, uma ferramenta fundamental para caracterizarem em que condições experimentais as MEs e CLs existem e em que proporções dos componentes e os tipos de estruturas podem estar presentes. (FORMARIZ *et al.*; 2005).

Os diagramas de fases foram inicialmente compostos pelos seguintes componentes: tensoativo (procetyl), co- tensoativo (ácido oleico), OESA e água foram misturados e deixados em equilíbrio durante um período de 12 horas.

Na construção do diagrama de fase, uma proporção específica de tensoativos, e OESA, foi misturado e deixado sob agitação magnética, á temperatura ambiente. As misturas foram diluídas com a fase aquosa, também a temperatura ambiente. Após a adição da fase aquosa, as misturas foram homogeneizadas a qual foi observado o aspecto visualizados sistemas estabilizados por tensoativos. Considerando-se as proporções dos componentes, os pontos obtidos após a adição de fase aquosa foram plotados no programa Sigma Plot® observando-se as possíveis transições dos sistemas (ME, CL, emulsão, dispersão e separação de fases).

A tabela 1 mostra a composição centesimal das amostras selecionadas. Foram selecionadas apenas amostras com características de microemulsões, transição de fase ME-CL e mesofases cristalinas (CL).

ENSAIO 1	Fase Aquosa (%)	OESA (%)	T/Cot 2:1 (%)
1:9	10	5	85
2:8	20	6	74
3:7	30	7	63
4:6	40	6	54
5:5	50	5	45

**Tabela 1.** Composição centesimal das amostras selecionadas do diagrama Procetyl, AO 2:1/ OESA/ Água.

### 4.3. Microscopia de Luz Polarizada

A identificação de isotropia dos sistemas, obtidos no diagrama de fase pseudo-ternário, foi realizada por Microscopia de Luz Polarizada em um microscópio Olympus BX-51 acoplado a uma câmera digital e software analisador PixelINK depois de percorrido o tempo mínimo de 5 dias para o equilíbrio dos sistemas no laboratório multiusuário do departamento de Física da Universidade Federal de Sergipe .

### 4.4. Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)

O arranjo estrutural dos sistemas escolhidos foi analisado a partir de medidas de Espalhamento de Raio X a Baixo Ângulo (SAXS) a temperatura ambiente. Os dados foram coletados em uma estação de medidas do Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS) em Campinas na estação D11A, equipada com um monocromador do tipo Si (111), com comprimento de onda de 1,499 Å. A intensidade de espalhamento  $I(q)$  é expressa em unidades arbitrárias, e o espalhamento do parasita (espalhamento de partículas existentes no sistema sem amostra) foi subtraído da intensidade total da amostra (FORMARIZ *et al.*; 2007).

### 4.5. Análises Reológicas.

O ensaio reológico de escoamento foi realizado no aparelho Reoplus AutoPar, variando a velocidade de cisalhamento de 0.1 a 200  $s^{-1}$  para as amostras de ME as formulações foram testadas à temperatura controlada de  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Uma geometria de cone placa foi utilizada (50 mm de diâmetro,  $1^{\circ}$  ângulo do cone). Cada amostra foi cuidadosamente aplicada à placa inferior ou dentro do estator do reômetro, assegurando o mínimo cisalhamento e permitindo um tempo de repouso (relaxamento da tensão induzida antes da análise) de 3 minutos antes de cada determinação.

A análise oscilatória foi realizada no Reoplus após a determinação da região viscoelástica linear a  $25 \pm 0.25^{\circ}\text{C}$  para as amostras de CL. O teste de oscilação realizado foi o de varredura de frequência. As formulações foram estudadas com solicitações

oscilatórias para determinar a evolução dos módulos de armazenagem ( $G'$ ) e de perda ( $G''$ ) em função da frequência (0,01 Hz a 30 Hz) a uma tensão de amplitude oscilatória fixa (1,00 Pa) obtida a partir da região viscoelástica linear. Os dados de ME e CL foram tratados no software Origin Pro v.8.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Extração do Óleo Essencial de *Syzygium aromaticum*

O OESA extraído, através da hidrodestilação, obteve um rendimento em torno de 3,67% (m/v). RAINA e Colaboradores (2001) obtiveram um rendimento de 4,8% (m/v) através da hidrodestilação. DONINELLI e colaboradores (2010) encontraram um rendimento de 3.64 % (m/v) do OESA através da hidrodestilação.

Contudo, podemos comprovar que o rendimento do OESA obtido através da hidrodestilação esta dentro dos limites encontrados na literatura. Esses valores variam entre 3,0 a 10% considerando seu rendimento satisfatório. (CARVALHO *et al.*; 2009, AFFONSO *et al.*; 2012).

A qualidade do cravo que depende da época da colheita pode ter interferido no rendimento deste. O fato de o OESA ter fácil solubilização em meio aquoso pode ter dificultado a separação e diminuindo o rendimento final.

#### 5.1.1. Cálculo da Densidade

A densidade do OESA encontrada na amostra analisada foi de 1.056 g/mL, este valor está próximo a densidade da água que é 1g/mL.. Desse modo, torna-se difícil a separação necessitando de um processo filtração para que ocorra a separação dos líquidos.

$$d_{20}^{20} = 1,056 \text{ g/ mL}$$

$$\rho_t = 1,005 \text{ g/mL}$$

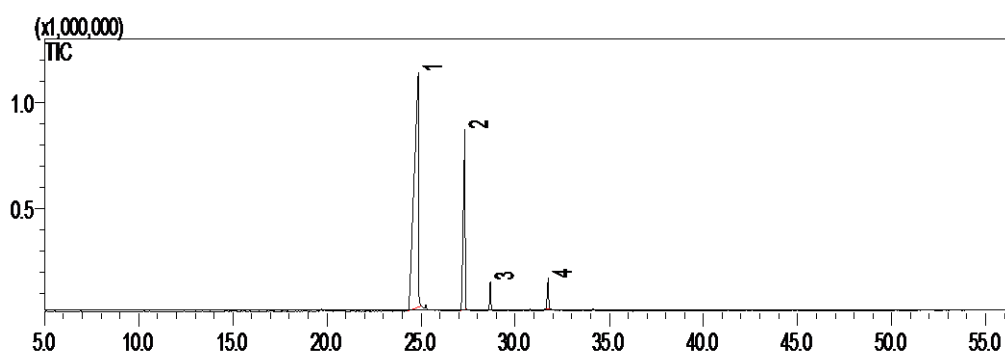
Na literatura foram encontrados valores que variam entre 0,8g /mL a 1,06g/mL. Esses valores demonstram que a densidade encontrada está dentro dos padrões encontrados na literatura (AFFONSO *et al.*; 2012 , BUCHBAQUER., 2010 ).

#### 5.1.2. Identificação dos Constituintes Químicos do OESA.

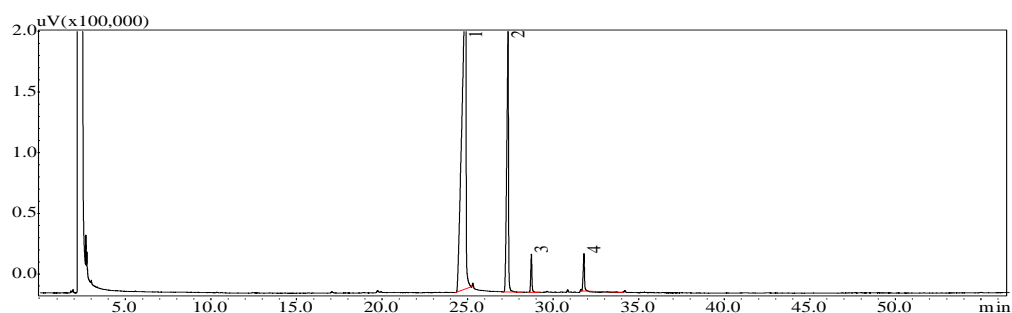
O resultado obtido acima indica que o Eugenol é o componente majoritário (71,92%), seguido do  $\beta$  - cariofileno (22,80%), Acetato de Chavibetol (2,89%) e  $\alpha$  - humuleno (2,39%).

PHASHAR *et al* (2006) encontraram o teor de eugenol de 78%, 13%  $\beta$ -cariofileno. Enquanto que Affonso e colaboradores (2009) encontraram, em seus experimentos, valores do componente majoritário de 82,47%, seguido do  $\beta$ -cariofileno (12,80%), Acetato de Chavibetol (2,89%) e  $\alpha$ -humuleno (2,39%). Desse modo, é possível observar que o OESA extraído pela metodologia proposta esta de acordo com os dados encontrados da literatura. Apresentando proporções semelhantes dos principais constituintes químicos do OESA relatados por outros autores na literatura. A concentração de fenilpropanóides, em especial o eugenol varia de acordo com a porção do vegetal analisada e a região na qual a planta foi cultivada. (WENQIANG *et al* .; 2007, AFFONSO *et al.*; 2012 ).

Santin e colaboradores, encontraram a ordem dos tempos de retenção (TR) dos constituintes majoritários do *S. aromaticum* : eugenol,  $\beta$ -cariofileno e acetato de chavibetol.



**Figura 6.** Cromatograma CG/EM do OESA. 1- Eugenol, 2-  $\beta$ -cariofileno, 3-  $\alpha$ -humuleno, 4- Acetato de chavibetol.



**Figura 7.** Cromatograma CG/DIC do OESA. 1- Eugenol, 2-  $\beta$ -cariofileno, 3-  $\alpha$ -humuleno, 4- Acetato de chavibetol.

PICO	TR	Composto	% GC/MS	% GC/FID	IR cal	IR lit
1	24,849	Eugenol	71,92	71,47	1363	1356
2	27,318	$\beta$ - cariofileno	22,80	24,35	1425	1417
3	28,679	$\alpha$ - humuleno	2,39	2,45	1460	1452
4	31,754	Acetato de chavibetol	2,89	1,73	1532	1524

**Tabela 2.** Teor dos componentes identificados através da cromatografia gasosa.

TR= tempo de retenção

IR (cal) = Índice de regularidade calculado na amostra.

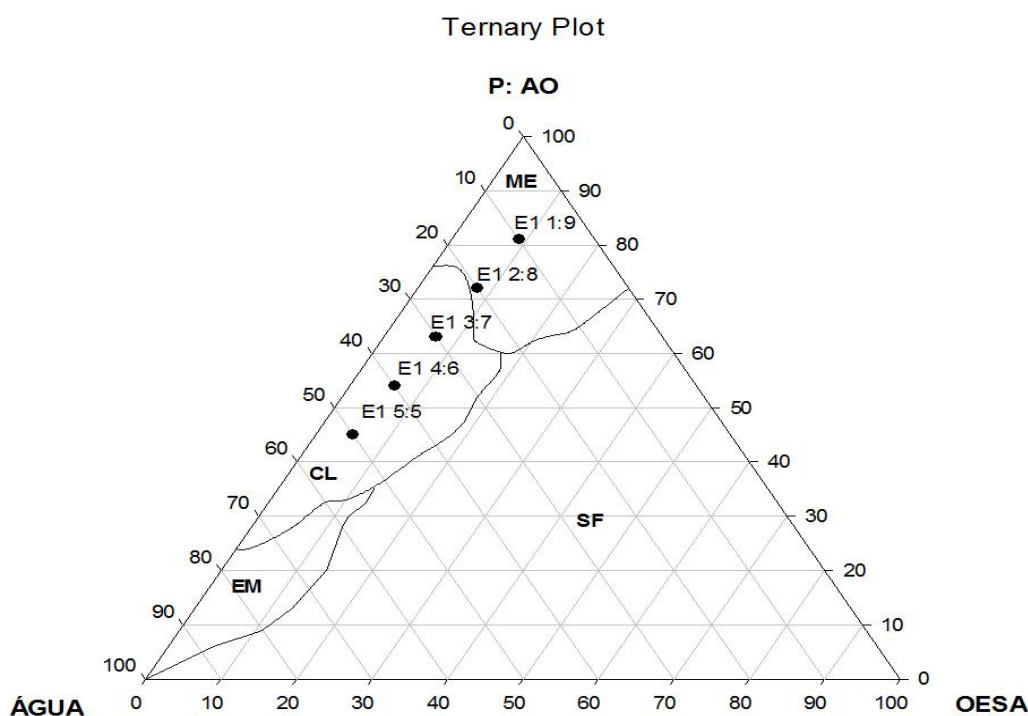
IR (lit.) =Índice de regularidade encontrado na literatura.

## 5.2. Obtenção do diagrama de fases

A figura 8 mostra o diagrama pseudoternário contendo procetyl e ácido oleico (AO) nas proporções 2:1 OESA/Água. É possível observar que foram encontradas quatro regiões: ME, CL, separação de fases (SF) e emulsão (EM). A região de ME apresenta entre 0-30% de fase aquosa, 70-100% de procetyl /ácido oleico 2:1 e de 0-30% de OESA. Nessa região foram encontradas 2 amostras de ME. Na região de CL, apresenta entre 30-70% de fase aquosa, 70-100% de procetyl /ácido oleico 2:1 e 0-20% de OESA, apresentando 5 amostras de CL.

Em uma linha de diluição na proporção 2:1 dos componentes das amostras preparadas, pode-se observar, com o aumento da fase aquosa, houve um aumento na estruturação das amostras, partindo de sistemas líquidos isotrópicos como ME, passando por sistemas de transição de fase ME-CL, partindo para sistemas viscosos como CL.

Os CL formados nessas regiões com maior concentração da fase aquosa ocasionando maior estruturação do sistema e uma maior viscosidade das amostras acima.



**Figura 8.** Diagrama pseudoternário: procetyl :acido oléico 2:1/ OESA/ Água. ME: microemulsão, CL: cristal líquido, EM: emulsão e SF: separação de fases.

### 5.3. Microscopia de luz polarizada

A microscopia de luz polarizada (MLP) permite verificar a isotropia dos sistemas, sendo eles birrefringentes ou não. Alguns CL exibem estruturas anisotrópicas, e com isso são obtidas imagens característica do tipo de fase formada. A fase lamelar pode ser identificada através da visualização das “cruzes de malta” e a fase hexagonal através da presença de estrias ou estruturas parecidas com fibras. Já as estruturas isotrópicas como as MEs e as fases cúbicas, por não desviarem a propagação da luz polarizada, são visualizadas como campo escuro (CHIVAS *et al.* ; 2009).

Na fotomicrografia da figura 09 representada por A e B, podemos apresentar a isotropias das amostras acima as qual representam estruturas de ME e transição de fases respectivamente. A amostra E1 1:9 (A) foi caracterizada como ME do tipo O/A devido às proporções de fase oleosa que esta em torno de 90% e a fase aquosa está em torno de 10 %. A amostra E1 2:8 (B) caracteriza regiões de transições de fases ME –CL o qual podemos observar a presença de pontos birrefringentes na amostra e a proporção de fase aquosa a qual está em torno de 20% e a fase oleosa em torno de 80%, entretanto não foi

bem definido o tipo de estrutura formada pela amostra, necessitando de outras análises como a SAXS e reologia para confirmar o resultado observado na amostra.

Nas fotomicrografias das figuras 10 representadas por E1 3:7 (C) e E1 4:6 (D) são observados presença de cruz de malta característico de CL de fase lamelar nas estruturas formadas.

Na fotomicrografia da figura 11, representado pela amostra E1 5:5 (E) observa-se a formação de cristais líquidos, uma vez que foi possível observar a presença de cruz de malta a este material. Nesta região pode observar uma maior viscosidade das amostras com uma maior estruturação do sistema. Isso pode ter ocorrido devido o aumento da fase aquosa que torna o sistema mais estruturado (CARVALHO *et al.*; 2010, BUCHBAUER,2010).

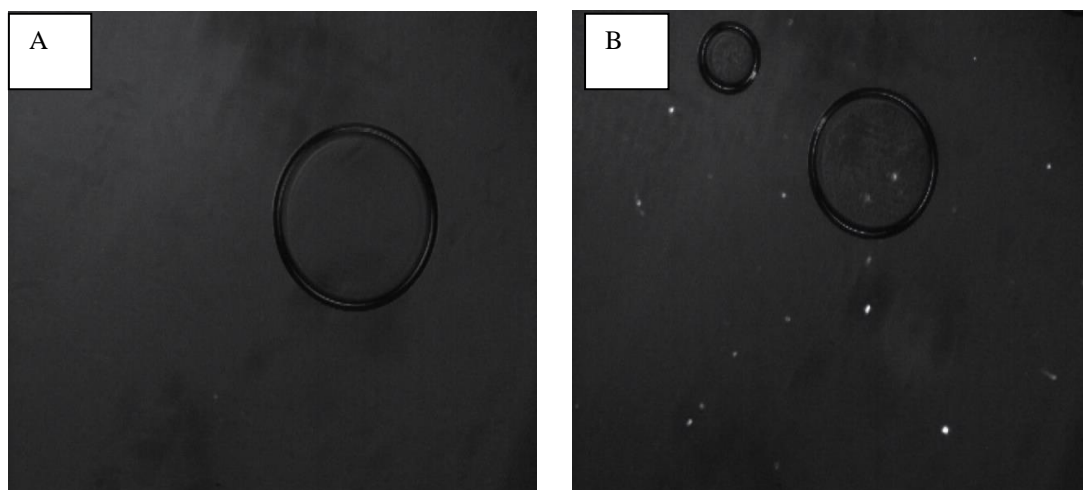
A fase aquosa representa cerca de 30 a 50% dos componentes das amostras de CL, tornando-as mais viscosas e com maior grau de estruturação promovendo a retenção do OESA na amostra para que possa ocorrer a sua liberação controlada.

Em seu trabalho Carvalho (2009) utilizou os mesmos tensoativo (procetyl) e co-tensoativo (ácido oleico) o qual encontraram os mesmos resultados nas regiões ME, transição de fases (TF) e CL, caracterizando maior grau de organização dos sistemas com o aumento proporcional de fase aquosa nas amostras acima.

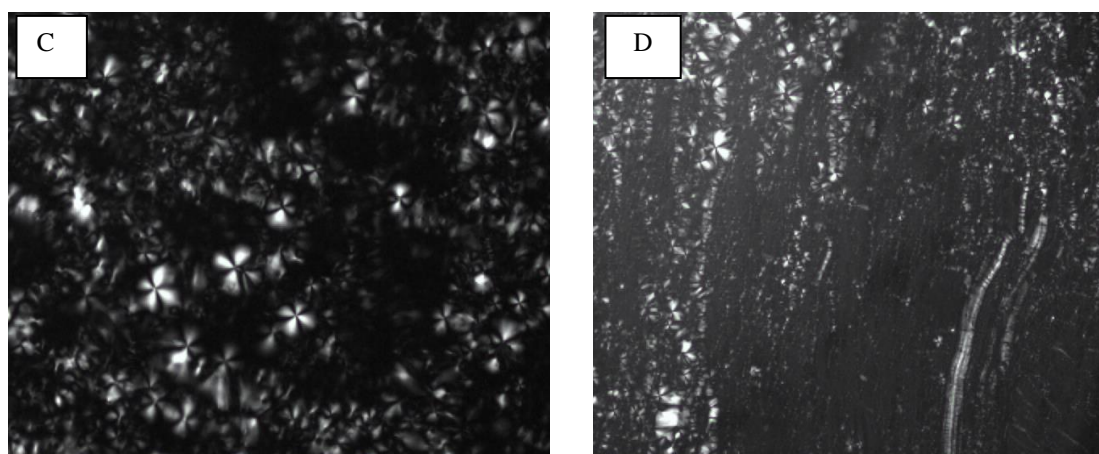
Para Rosoff, (2007), a proporção correta entre fase oleosa/ tensoativo / fase aquosa é de extrema importância para a formação de sistemas líquido-cristalinos lamelares, uma vez que a interação entre esses componentes proporciona a formação de CLs com o aumentando a estabilidade das formulações.

Portanto podemos observar que todas as amostras apresentadas acima foram classificadas como: microemulsões, transição de fases e cristais líquidos do tipo lamelar, respectivamente, porém apresentando imagens distintas devido à proporção de fase aquosa e dos constituintes presentes nas amostras de cristais líquidos.

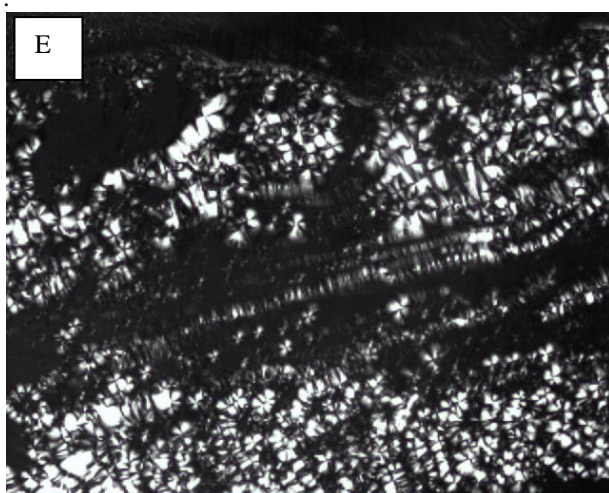




**Figura 9.** Imagem obtida por microscopia de luz polarizada, representando a isotropia das formulações E1:1:9(A); E1 2:8 (B) sendo característica microemulsão e transição de fase respectivamente .



**Figura 10.** Imagem obtida por microscopia de luz polarizada, representando a anisotropia das formulações E1 3:7 (C); E1 4:6 (D) sendo características de estruturas de cristais líquidos de fase lamelar.



**Figura 11.** Imagem obtida por microscopia de luz polarizada, representando a anisotropia da formulação E1 5:5 (E) sendo característica de estrutura de cristal líquido de fase lamelar.

#### 5.4. Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS).

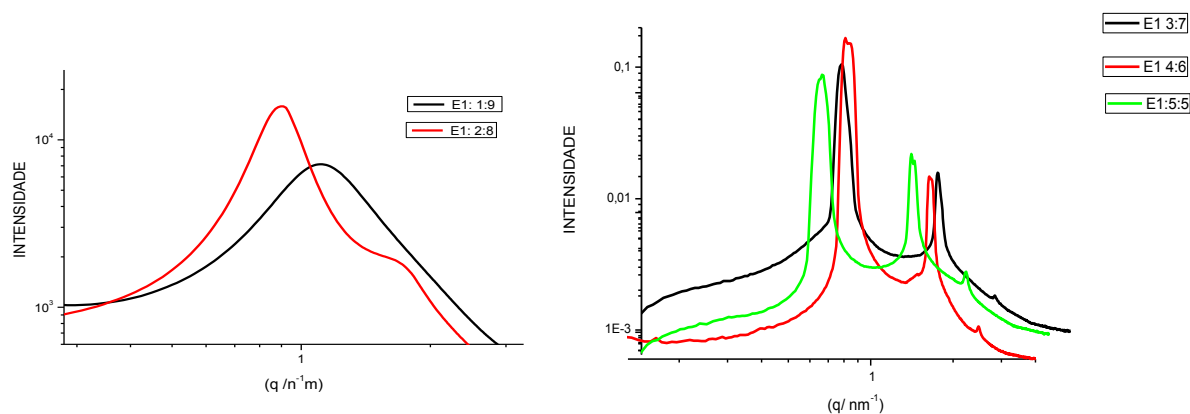
A utilização da técnica de Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) na caracterização de sistemas é explicada pela possibilidade de se determinar tamanho médio e a distância entre os objetos espalhadores, como gotículas, micelas ou estruturas cristalinas. Além disso, essa técnica permite avaliar a estrutura de objetos espalhadores, mesmo que eles não estejam organizados de forma ordenada (CHIVAS *et al.* ; 2009). A curva de SAXS na amostra E1 1:9 (A) representa uma estruturas de microemulsão (ME) do tipo O/A com apenas único amplo pico de baixa intensidade. Já a amostra E1 2:8 (B), é característica de transição de fases (TF) a mesma apresentou um pico definido, porém com a presença da formação de um segundo pico ou ombro, indicando uma maior grau de estruturação desse sistema em relação ao E1: 1:9(A) , sendo considerada uma transição de fases ME-CL. Como existem apenas dois picos com  $q : 1:2$ , é possível determinar a estrutura e a fase líquida cristalina., combinando os dados de microscopia com a informação diagrama de fases e SAXS é plausível atribuir as estrutura da amostra como sendo região de transição de ME-CL de fase lamelar (BIZZO *et al.* ;2009; CHIVAS *et al.* ;2000, YAN *et al.* ; 2012).

Já na curva das amostras E1 3:7 (C), E1 4:6 (D) e E1 5:5 (E) são observadas curvas típicas de cristais líquidos, devido a presença de três picos definidos de alta intensidade e a razão entre esses picos são na proporção de 1:2:3 característico de cristal líquido de fase lamelar (BIZZO *et al.* ; 2009 , CHIVAS *et al.* ; 2009).

Os valores do espalhamento  $q$  vetor correspondendo aos picos de espalhamento aparecem em razão  $q_1:q_2:q_3 = 1:2:3$ , para as amostras E1 3:7, E1 4:6 e E1 5:5 , as quais são bem conhecidas por ser característica de periodicidade lamelar.

Os resultados são comprovados através do ensaio E1 1:9 (A) para E1 5:5(E) os quais apresentam uma linha de diluição de ordem crescente da fase aquosa, tornando - as mais estruturadas, possibilitando uma melhor incorporação da substância ativas nas formulações.

Podemos observar que a medida que foi aumentando a fase aquosa nas amostra, tornou a organização no sistema tornou -se mais estruturado. Essa organização foi verificada através da transição de sistemas fluidos e de menor grau de organização como microemulsões para sistemas mais organizados como os cristais líquidos que são sistemas de alto grau de organização o que podemos comprovar através das análises de microscopia e de SAXS realizadas.



**FIGURAS 12.** Gráficos representando amostras de saxs.

Formulações	$q \text{ Max, } 1$	$q \text{ Max, } 2$	$q \text{ max, } 3$	$q2/q1$	$q3 /q1$	Estrutura
E1 1:9	0.82	---	----	----	----	ME
E1 2:8	0.91	1,89	---	2.0	----	ME/CL
E1 3:7	0.81	0.160	0,210	2.0	3.0	CL
E1 4:6	0.78	0.156	0,240	2.0	3.0	CL
E1 5:5	0.68	0.142	0,,210	2.0	3.0	CL

**Tabela 3:** Representando os valores de X dos picos nas amostras de SAXS E1 1:9 a E1 5:5.

### 5.5.Analise Reológica

O principal parâmetros que podemos obter na amostras de reologia são: módulo de armazenamento  $G'$ , Módulo de perda  $G''$ , módulo complexo  $G^*$ , e a viscosidade complexa. Observamos nas regiões viscoelástica linear distinta para cada amostra acima. Com base nos resultados propostos por SAXS e microscopia é possível verificar que com o aumento da fase aquosa, houve um aumento nos valores de tensão crítica e do módulo elástico, indicando que com o aumento do conteúdo aquoso, as amostras estão se tornando mais elásticas, e assim apresentam uma maior organização na estrutura e conseqüentemente maior resistência a tensão aplicada, corroborando com os resultados de MLP e SAXS (GONSENCA *et al.*;2013).

Sistemas isotrópicos, como as ME apresentaram uma baixa viscosidade e comportamento newtoniano, devido ao pequeno tamanho de gotícula e baixa interação entre as gotículas (SANTANA *et al.*, 2012).

No entanto os sistemas de CL apresentam alta viscosidade e comportamento não newtoniano (CHORILLI *et al.*;2011). Por serem sistemas viscoelásticos, que apresentam características de sólidos elásticos e fluidos viscosos, esses sistemas são submetidos à varredura de frequência.

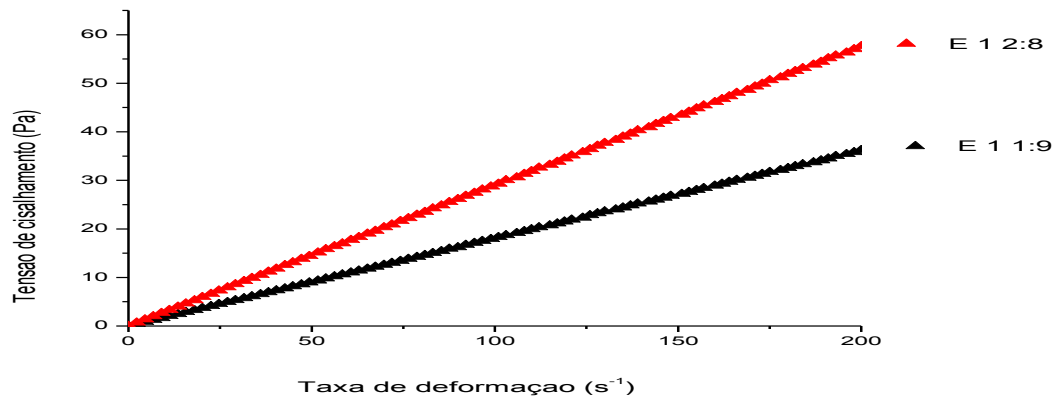
Desse modo, a região viscoelástica linear (RVL) pode ser definida, como também as curvas de frequência com os parâmetros viscoelásticos, módulo de armazenamento ( $G'$ ), módulo de perda ( $G''$ ) e viscosidade complexa (GOSENCA *et al.*;2013).

$G'$  é a habilidade do material de armazenar energia, enquanto  $G''$  é a habilidade do material de dissipar energia. Se  $G'' > G'$ , o material apresenta comportamento de um líquido viscoso. Se  $G' > G''$ , o sistema apresenta comportamento de um sólido elástico, tal com um gel. Em contrapartida, se  $G'' = G'$  o material está na transição (CRUZ *et al.*; 2008).

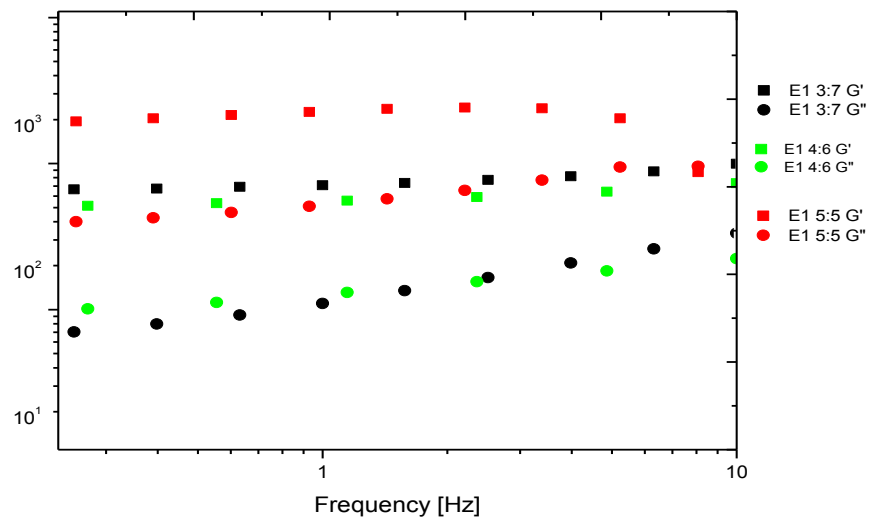
Além disso, o módulo de armazenamento  $G'$  é maior do módulo de perda  $G''$  nas regiões viscoelástica linear, indicando que a elasticidade é mais proeminente do que viscosidade. Durante a deformação crítica,  $G'$  diminui muito mais rápido do que  $G''$  o que significa que a propriedade poderia ter a elasticidade mais facilmente alterada pela tensão aplicada. Dada a região viscoelástica para cada amostra e seleccionado o valor apropriado de tensão e realizada a cisalhamento oscilatório e as medições de varredura de frequência. (CHIVAS *et al* 2012).

Segundo Chivas e colaboradores 2010, a maioria de sistemas de cristais líquidos lamelares tem estrutura gel com módulo de armazenamento  $G'$  e módulo de perda  $G''$  permanecem constantes com  $G' > G''$ ; a viscosidade complexa cai linearmente como uma função da frequência módulos ( $G'$  e  $G''$ ) aumentam com o aumento da frequência com diferentes concentrações.

A dependência da frequência do módulo de armazenamento  $G'$  e perda módulo  $G''$  para várias amostras líquidas cristalinas podemos confirmar a reologia é semelhante de fase líquido cristalina de fase lamelar.No que segue o padrão reológico semelhante em baixa frequência,  $G' > G''$ , mostrando o comportamento viscoso das amostras acima.



$G', G''$  (Pa)



**FIGURAS 13** . Representando as amostras de análises reológicas.

## 6. CONCLUSÃO

Foram obtidos sistemas nanoestruturados a partir da mistura de PPG-5 CETETH-20 (procetyl): AO (ácido oleico) 2:1 OESA/Água. Esses sistemas apresentam um aumento na organização, à medida que a fase aquosa foi aumentada, passando de sistemas líquidos isotrópicos de baixa organização (microemulsões) para sistemas viscosos altamente estruturados, se comportando desse modo como sistemas precursores de fase líquido cristalino.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Affonso, R. S.; Rennó, M. N.; Slanna, G. B. C. A.; França, T. C. C. Aspectos Químicos e Biológicos do Óleo Essencial de Cravo da Índia. *Rev. Virtual Quim.*, 2012, 4 (2), 146-161.

Agencia Nacional de Vigilancia Sanitária . Farmacopéia Brasileira. 5. ed. Brasília: Anvisa, v. 2, 2010.

Ansel, H. C., Allen L. V. JR., Popovic N. G., Formas Farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos, 8ª ed., Artmed editora S.A., 2005.

Ashurts, P. R. Food Flavorings. 3 ed. Springer: Verlag, 1990.

Auton, M. E. Delineamento de formas farmacêuticas. 2.ed. Porto Alegre: Artmed. 2005.

Bakkali, F.; Averbek, S.; Averbek, D.; Idiomar, M. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*. 46, 2008, p.446–475.

Brava / IA Valle D. *aedes aegypti*. Histórico do controle no Brasil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*. 2007;16 (2)113-118.

Brushi, M.L.; Panzeri, H.; Freitas, O.; Lara, E. H. G.; Gremião, M.P.D. Sistemas de liberação de fármaco intrabolsa periodontal. *Rev. Bras. Cien. Farm.*, v.42,n.1, p. 31-47, 2006.

Campos, J.; Andrade, C. F. S. Susceptibilidade larval de duas populações de *Aedes aegypti* a inseticidas químicos. *Ver. Saúde Pública*. 35 (3) :232-6, 2001.

Carvalho FC, Campos ML, Peccinini RG, Gremião MPD. Nasal administration of liquid crystal precursor mucoadhesive vehicle as an alternative antiretroviral therapy. *Eur J Pharm Biopharm*. 2013; 84(1): 219–27.

Carvalho, Flávia Chiva

Desenvolvimento e caracterização de sistemas nanoestruturados para potencial administração nasal de zidovudina. / Flávia Chiva Carvalho. – Araraquara, 2009.

Carvalho, m. s. l.; Caldasb, e. d.; degallierc, n.; vilarinhosa, p. t. r.; Souza, l. c. k. r.; yoshizawa, m. a. c.; knoxa, m. b.; Oliveira, c. suscetibilidade de larvas de aedes aegypti ao inseticida temefós no distrito federal, ver. saúde pública, 2004, 38 (5) :623-9.

Cavalcanti ESB, De Moraes SM, Lima MAA, Santana EWP. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti* L. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004; 99(5): 541-4.

Chaieb, K.; Hajlaoui, H.; Zamantar, T.; Kahla-Nakbi, A.B.;Rouabhia, M.; Mahdouani, K.; Bakhrouf, F. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L Myrtaceae): a short review. Phytother. Res., 21, 2007, pp. 501–506.

Costa, J. G. M.; Rodrigues, F. F. G.; Angélico, E. C.; Silva, M. R.; Mota, M. L.; Santos, N. K. A.; Cardoso, A. L. H; Lemos, T. L. G. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptismartiusii*, *Lippiasidoides* e *Syzygium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. Brazilian Journal of Pharmacognosy 15(4): 304-309, 2005.

Coordenação de Vigilância Epidemiológica da Secretaria de Estado da Saúde(CVE/SES). Sergipe. Informe epidemiológico sobre situação da dengue em Sergipe Janeiro a Maio de 2015. [online] Sergipe: Núcleo de Endemias; 2015. [acesso em 22 jan 2015] Disponível em:  
<[http://www.saude.se.gov.br/hotsite/dengue2015/pdf/janeiro\\_dezembro.pdf](http://www.saude.se.gov.br/hotsite/dengue2015/pdf/janeiro_dezembro.pdf)>.

Cruz SA, Farah M, Zanin M, Bretas RES. Avaliação das propriedades reológicas de blendas de PEAD virgem/PEAD reciclado. Polímeros, São Carlos. 2008; 18(2): 144-51.

Cunha Junior AS, Fialho SL, Carneiro LB, Orefice F. Microemulsões como veículo de drogas para administração ocular tópica. Arq Bras Oftalmol, São Paulo. 2003; 66(3): 385-91.

Damasceno D.P.G.I, Silva J.A., Oliveira E.E., Silveira W.I.I, Araújo I.B., Oliveira A.G. et al. microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis. rev.ciênc.farm. básica apl. 2011; 32(1): 9-18.



DANIELSSON, I.; LINDMAN, B. The definition of microemulsion. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. v.3, n.4, p.391-392, 1981.

Djekic L, Primorac M, Jockovic J. Phase behaviour, microstructure and ibuprofen solubilization capacity of pseudo-ternary nonionic microemulsions. *J. Mol Liq*. 2011; 160: 81–87.

Evangelista, R. C. Sistemas de liberação controlada de fármacos. Tese (Livre Docência)– Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara:2006, 345 f.

Ferreira Sarah G., A. Sistemas nanoestruturados obtidos a partir do óleo essencial de *Citrus sinensis* L. Osbeck /AGUA estabilizados por tensoativos: avaliação estrutural e potencial uso no controle larvídico contra larvas de *Aedes aegypti*. [Dissertação] Sergipe – Universidade Federal de Sergipe, 2014.

Fiocruz. Vetor da dengue na Ásia, *A. albopictus* é alvo de estudos. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=576&sid=32>>. Acesso 2010.

Fonseca Bal, Fonseca SNS. Dengue vírus infections. *Curr Opin Pediatr*.2002; 14:1, 67-71.)

Formariz, T. P. Urban, M. C. C.; Silva Junior, A. A.; Gremião, M. P. D;Oliveira, A. G. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, v.41, no.3, p.301-313, 2005.

Formariz T. P. *et al.* Structure and viscoelastic behavior of pharmaceutical biocompatible anionic microemulsions containing the antitumoral drug compound doxorubicin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2010; 77: 47–53.

GADELLHA, D.P. & TODA, A.T. Biologia e comportamento do *Aedes aegypti*. *Rev. Bras. Malariol*, 1985, vol. 37, p. 29-36.

Gonsenca M, Bešter-Rogac M, Gašperlin M. Lecithin based lamellar liquid crystals as a physiologically acceptable dermal delivery system for ascorbyl palmitate. *Eur J. Pharma Sci.* 2013; 50(1): 114–122.

Guo C, Wang J, Cao F, Lee RJ, Zhai G. Lyotropic liquid crystal systems in drug delivery. *Drug Discov Today.* 2010; 15(23-24): 1032-1040.

Hernández-Sánchez, P.; López-Miranda, S.; Lucas-Abellán, C.; Núñez-Delicado, E. Complexation of Eugenol (EG), as main component of clove oil and as pure compound, with  $\beta$ - and HP- $\beta$ -CDs. *Food and Nutrition Sciences*, 2012, 3, p. 716-723.

Ishak, R. Dengue: Aspectos clínico, epidemiológico, laboratorial e de profilaxia. *Bras. Med.* vol. 24, p. 5-10, 1987.

J.G.Galvão ,B-cicloextrin inclusion complexes containing Citrus Sinensis (L) Osbek essential oil: alternative to control aedes aegypti larvae.[Dissertação] :Sergipe; Universidade Federal de Sergipe., 2015.

KLEIN, T. Desenvolvimento de sistemas nanoestruturados estabilizados com álcool cetílicoetoxilado e propoxilado contendo fluconazol potencialmente ativo contra esporotricose. [Dissertação] :São Paulo , Universidade Estadual Paulista, Araraquara., 2007. 114f. Thalita.

Kato Naomi Simas, Elisangela da Costa Lima, Sheila da Rocha Conceição, Ricardo Machado Kuster\* e Alfredo Martins de Oliveira Filho produtos naturais para o controle da transmissão da dengue – atividade larvicida de *myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides.

Jandimara Doninelli Fior Silvestri<sup>I</sup>; Natalia Paroul<sup>II</sup>; Eliane Czyewski<sup>I</sup>; Lindomar Lerin<sup>III</sup>; Ieda Rotava<sup>III</sup>; Rogério Luis Cansian<sup>IV</sup>; Altemir Mossi<sup>IV</sup>; Geciane Toniazzo<sup>V</sup>; Débora de Oliveira<sup>V</sup>; Helen Treichel .Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.)*Rev. Ceres* vol.57 no.5 Viçosa Sept./Oct. 2010.

MARZOCHI, K.B.F. Dengue in Brazil- Situation, transmission and control - a proposal for ecological control. *Mem.Inst. Oswaldo Cruz*.vol. 89, p. 235-245,1994.

MONATH, T.P. Dengue: The risk to developed and developing countries. *Proc Natl Acad Sci USA*. vol.91, p. 2395-2400, 1994.

Minying Zheng, Zhengwu Wang, Feng Liu, Qin Mi, Jinhong wu Study on the microstructure and rheological property of fish oil lyotropic liquid crystal. Department of Food Science & Technology and Bor Luh Food Safety Center, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, PR China May 2011.

Nkya, T.E.; Akhouayri, I; Kisinza W., David, J.P. Impact of environment on mosquito response to pyrethroid insecticides: Facts, evidences and prospects. *Insect Biochem Mol Biol*. 2013; 43(4): 407-16.

Oliveira, A. G.; Scarpa, M. V.; Correa, M. A.; Cera, L. F. R.; Formariz, T. P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. *Quim. Nova*, v. 27, n. 1, p. 131-138, 2004.

Panfeng Long, Hui Yan, Xiaohui Guo, Jingcheng Hao Lyotropic liquid crystal phases of lithium perfluorinated fatty acid salts in aqueous solutions and molecular dynamics study of the lamellar phase

Key Laboratory of Colloid and Interface Chemistry (Shandong University) and Key Laboratory of Special Functional Aggregated Materials, Ministry of Education, Jinan 250100, China 2012.

Pondeiro, A.; Técnicas e operações unitárias em química laboratorial, 4. ed., Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa, 2003.

Ranson, H.; Burnan, J.; Lumijuan, N.; Black, W.C. Insecticide resistance in dengue vectors. *TropIKA.net*. 2010; 1(1).

Santos, A. Sistemas emulsionados a base de óleo essencial de *Citrus sinensis* L. Osbeck: Caracterização e avaliação do efeito contra larvas de *Aedes aegypti* [Dissertação] Sergipe – Universidade Federal de Sergipe; 2012.

Silva, V. F. Complexos de inclusão de óleo essencial de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck em  $\beta$ -ciclodextrinas: obtenção, caracterização e avaliação da atividade larvívica contra larvas do *Aedes aegypti* [Dissertação]. SERGIPE: – Universidade Federal de Sergipe;2012.

Silva, W.J.; Dória, G.A.A.; Maia, R.T.; Nunes, R.S.; Carvalho, G.A.; Blank, A.F.; Alves, P.B.; Marçal, R.M.; Cavalcanti, S.C.H., effects of essential oils on *aedes aegypti* larvae: alternatives to environmentally safe insecticides, *bioresource technology*, 2008, 99, p.3251–3255.

Humberto R. Bizzo

Embrapa Agroindústria de Alimentos, 23020-470 Rio de Janeiro - RJ, Brasil

Ana Maria C. Hovell e Claudia M. Rezende.

Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21945-970 Rio de Janeiro - RJ, Brasil.

Tarek. M.Y. El-sheikh\*, Zarrag I.A. Al-Fifi, Mohamed A. Alabboud Larvicidal and repellent effect of some *Tribulus terrestris* L., (*Zygophyllaceae*) extracts against the dengue fever mosquito, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) . Received 5 May 2012; accepted 29 May 2012.

Wang Z, Diao Z, Liu F, Li G, Zhang G. Microstructure and rheological properties of liquid crystallines formed in Brij 97/water/IPM system. *J Colloid Interface Sci.* 2006 May 15; 297(2): 813-8.

Zhao X-Y, Cao Q, Zheng L-Q, Zhang G-Y. Rheological properties and microstructures of gelatin-containing microemulsion-based organogels. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.* 2006; 281: 67–73

Zheng M, Wang Z, Liu F, Mi Q, Wu J. Study on the microstructure and rheological property of fish oil lyotropic liquid crystal. *Colloid Surface A.* 2011; 385(1-3): 47– 54.